

# 喜树愈伤组织诱导与抑制褐化的研究

张彦波 龚霞峰 胡江琴 庞基良 王利琳\* (杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江杭州 310036)

**摘要** [目的] 筛选喜树外植体的最佳诱导培养基, 研究抑制外植体及继代愈伤组织褐化的方法。[方法] 以喜树的幼叶和种胚作为外植体, 通过测定过氧化物酶和多酚氧化酶的活性, 从外植体选择、培养基种类、激素配比、添加物的处理等方面进行愈伤组织的诱导和抑制外植体及继代愈伤组织褐化的研究。[结果] 幼叶外植体的最佳诱导培养基为: SH+ NAA 2.5 ng/L + 2,4-D 0.5 ng/L + 6-BA 0.25 ng/L; 种胚外植体的最佳诱导培养基为: MS+ 2,4-D 1.0 ng/L + 6-BA 0.5 ng/L。抑制幼叶外植体褐化的方法为: 增加外植体大小, 吹干培养基表面水分。抑制愈伤组织继代培养褐化的方法为: 最佳诱导培养基附加 30 ng/L 抗坏血酸和 5 g/L 活性碳; 1 次继代后, 将质地致密的愈伤组织转移到 MS 培养基上培养。[结论] 该研究为喜树的遗传转化和植株再生提供理论基础。

**关键词** 喜树; 幼叶; 种胚; 愈伤组织; 褐化

中图分类号 Q946 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)36-11902-03

**Studies on the Callus Induction and Browning Inhibition of** *Camptotheca acuminata*

**ZHANG Yan bo et al** (College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036)

**Abstract** [Objective] The research aimed to screen out the optimum induction medium for *Camptotheca acuminata* explants and study the methods of inhibiting browning of explants and callus in subculture. [Method] With the young leaves and seed embryos as explants, through determining POD and PPO activities, the study on callus induction and inhibiting the browning of explants and callus in subculture was conducted from aspects such as explant selection, medium kinds, hormone matching and treatment of adding matter. [Result] The optimal induction medium was SH+ NAA 2.5 ng/L + 2,4-D 0.5 ng/L + 6-BA 0.25 ng/L for the explants of young leaves and MS+ 2,4-D 1.0 ng/L + 6-BA 0.5 ng/L for the explants of seed embryos. The way to inhibit the browning of young leaf explants was to enhance explants sizes and dry the water on the surface of medium. The way to inhibit the browning of callus in subculture was to supplement 30 ng/L VC and 5g/L AC into the optimal induction medium or to transfer the compact callus to MS medium after the first subculture. [Conclusion] This study provides theoretical base for genetic transformation and plant regeneration of *C. acuminata*.

**Key words** *Camptotheca acuminata*; Young leaf; Seed embryo; Callus; Browning

喜树(*Camptotheca acuminata* Decne.) 为珙桐科喜树属植物, 是我国的特有植物。自从 1966 年美国的 WALL 博士<sup>[1]</sup> 首次发现喜树中含有抗肿瘤活性物质喜树碱(Comptothecine, CPI), 1985 年 Hsang 等<sup>[2]</sup> 进一步揭示喜树碱是作为一种拓扑异构酶(Topoisomerase) 的抑制剂而具有抗癌活性以来, 关于喜树碱的研究越来越受到重视。近年来, 喜树碱的研究成为医学和生命科学的研究热点, 研究较多集中在喜树愈伤组织诱导<sup>[3]</sup>、细胞培养<sup>[4]</sup> 和植株再生<sup>[5]</sup>, 喜树碱的结构<sup>[6]</sup> 和检测<sup>[7]</sup>, 衍生物的合成和临床应用<sup>[8]</sup> 等方面。然而, 喜树野生资源有限, 通过组织培养技术产生喜树药用成分将是解决这一问题的有效途径。褐化现象是组织培养的常见问题, 在其他植物中研究很多<sup>[9-10]</sup>, 但有关抑制喜树愈伤组织褐化的方法未见报道。笔者从外植体选择、培养基种类、激素配比、添加物的处理等方面着手研究抑制褐化的方法, 并通过测定处理组过氧化物酶和多酚氧化酶的活性, 筛选到了较高诱导频率的激素组合和比较理想的抑制褐化的方法, 为进一步的遗传转化、细胞悬浮培养和植株再生提供基础。

## 1 材料与方

**1.1 材料处理** 取 7、8 月份喜树枝条顶端的幼叶和 11、12 月份的成熟果实作为供试材料, 均采自杭州师范大学校园内。供试材料采取后, 幼叶用自来水冲洗干净, 喜树果实剥去果皮, 于超净工作台放于烧杯, 70% 酒精消毒 30 s, 用无菌水清洗 2 次, 再用 0.1% 升汞消毒 6 min, 用无菌水清洗 4 次, 幼叶用剪刀剪成 0.5 cm × 0.5 cm 和 1.5 cm × 1.5 cm 大小, 种子剥去种皮, 得到离体胚, 于无菌条件下接种入诱导愈伤组织培养基中, 每瓶培养基放置外植体 4~5 个, 在 (25 ± 1) °C、

光照强度 1 500~2 000 lx、光照 12 h/d 条件下培养。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 愈伤组织诱导和抑制褐化。** 愈伤组织诱导采用 4 因素 3 水平正交试验设计  $L_9(3^4)$ 。基本培养基 SH、B5、MS、NAA 的 3 个水平为 0、2.5、5.0 ng/L, 2,4-D 的 3 个水平为 0.25、0.50、1.00 ng/L, 6-BA 的 3 个水平为 0.25、0.50、1.00 ng/L。每种培养基接种 30 个外植体, 30 d 时统计愈伤组织的诱导率和生长势, 3 次重复。用软件正交设计助手做直观分析和方差分析。抑制褐化试验: 将愈伤组织接种到 MS+ 2,4-D 1.0 + 6-BA 0.5 的培养基中, 并以此作对照, 6 个处理: 添加 30 ng/L 柠檬酸; 添加 30 ng/L 抗坏血酸; 添加 5 g/L 活性碳; 添加 30 ng/L 柠檬酸+ 5 g/L 活性碳; 添加 30 ng/L 抗坏血酸+ 5 g/L 活性碳; 添加 30 ng/L 柠檬酸+ 30 ng/L 抗坏血酸+ 5 g/L 活性碳。30 d 时统计褐化率和愈伤组织生长势。

**1.2.2 过氧化物酶(POD) 和多酚氧化酶(PPO) 酶活力的测定。** 酶的提取。取继代培养 30 d 时的愈伤组织 1 g, 加入 2 ml 0.1 mol/L pH 6.5 磷酸缓冲液(PBS) 研磨, 4 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为酶液。POD 酶活力的测定。室温, 在波长为 470 nm 的条件下, 取 1 ml 酶液, 3 ml 反应混合物(0.1 ml/L 磷酸缓冲液 pH 6.0 100 ml, 加入愈创木酚 56 μl 和 30% 过氧化氢 38 μl) 混合比色。以每毫升酶液每分钟引起吸光值改变 0.001 为 1 个酶活力单位。每种样品重复 3 次。PPO 酶活力的测定。室温, 在波长为 417 nm 的条件下, 取 1 ml 酶液, 1 ml 缓冲液, 1 ml 底物(0.1 mol/L 邻苯二酚) 混合比色。以每毫升酶液每分钟引起吸光值改变 0.001 为 1 个酶活力单位。每种样品重复 3 次。

## 2 结果与分析

**2.1 外植体大小及培养基处理对喜树愈伤组织诱导和外植体褐化的影响** 幼叶外植体愈伤组织初次诱导时, 外植体经

基金项目 杭州市属高校重点实验室科技创新项目(2006831HD4)。

作者简介 张彦波(1982-), 男, 河北武安人, 硕士研究生, 研究方向: 植物遗传学。\* 通讯作者, 博士, 教授。

收稿日期 2007-08-31

常出现褐化死亡的现象,导致诱导率降低。经过分析,可能与外植体大小和培养基表面存在的水分有关系。以MS作为基本培养基,附加2,4-D 0.5 ng/L+6-BA 0.5 ng/L,设计4种处理:A,外植体大小0.5 cm×0.5 cm,培养基不经吹干;B,外植体大小0.5 cm×0.5 cm,培养基经过吹干;C,外植体大小1.5 cm×1.5 cm,培养基不经吹干;D,外植体大小1.5 cm×1.5 cm,培养基经过吹干。由表1可见,外植体大小对愈伤组织的诱导率影响很大,1.5 cm×1.5 cm 幼叶外植体愈伤组织的诱导率显著高于0.5 cm×0.5 cm的。培养基中水分吹干则能有效地降低外植体的褐化率。种胚的外植体诱导愈伤组织时受外植体大小和培养基水分的影响不明显。

表1 外植体大小及培养基处理对愈伤组织诱导和外植体褐化的影响

处理	外植体数量 个	褐变数 个	愈伤数 个	最早出现时间 d	诱导率 %	褐化率 %
A	78	67	0	-	0	85.90
B	70	52	5	20	7.14	74.29
C	64	21	30	18	46.88	32.81
D	62	3	41	15	66.13	4.84

表2 不同培养基和激素组合对喜树外植体愈伤组织诱导的影响

培养基	激素 ng/L	外植体	愈伤组织外观	诱导率 %	生长势
SH	2,4-D 0.25 + 6-BA 0.25	幼叶	黄绿色,球状,质地致密	92.22 ± 1.92	-
		种胚	白色,球状,质地致密	46.67 ± 3.33	-
	NAA 2.5 + 2,4-D 0.50 + 6-BA 0.50	幼叶	白色,小球状,质地致密	97.78 ± 1.92	+
		种胚	浅黄色,球状,质地致密	45.56 ± 1.92	-
B5	2,4-D 0.50 + 6-BA 1.00	幼叶	浅黄色,球状,质地致密	88.89 ± 1.92	-
		种胚	浅黄色,球状,质地致密	38.89 ± 3.85	+
	NAA 2.5 + 2,4-D 1.00 + 6-BA 0.25	幼叶	浅红色,质地较松软	88.89 ± 5.09	+
		种胚	浅红色,质地较松软	74.44 ± 1.92	+
MS	2,4-D 1.00 + 6-BA 0.50	幼叶	暗红色,质地较松软	85.56 ± 1.92	+
		种胚	浅红色,质地较松软	76.67	++
	NAA 2.5 + 2,4-D 0.25 + 6-BA 0.50	幼叶	暗红色,质地较松软	77.78 ± 5.09	+
		种胚	浅红色,质地较松软	70.00 ± 3.33	+
MS	2,4-D 1.00 + 6-BA 0.50	幼叶	黄绿色间杂暗红色,松软	61.11 ± 1.92	++
		种胚	浅红色,质地松软	100.00	+++
	NAA 2.5 + 2,4-D 0.25 + 6-BA 1.00	幼叶	黄绿色间杂暗红色,松软	58.89 ± 3.85	++
		种胚	暗红色,质地松软	96.67 ± 3.33	+++
NAA 5.0 + 2,4-D 0.50 + 6-BA 0.25	幼叶	黄绿色间杂暗红色,松软	60.00 ± 5.77	++	
	种胚	暗红色,质地松软	92.22 ± 3.85	+++	

注:生长势+++ 生长最快;++ 生长较快;+ 一般;- 较差。表3同。

2.3 不同附加物对抑制愈伤组织褐化的影响 从表2得知,种胚在MS+2,4-D 1.00+6-BA 0.50的培养基上愈伤组织诱导率达100%,以此进行愈伤组织抗褐化试验。愈伤组织在此培养基上培养30 d后,或在此培养基上进行继代培养过程中,愈伤组织总是产生褐化现象。由表3可见,处理褐化率最低。由图1、图2可见,处理可对POD和PPO酶活性产生一定的抑制作用,进而使愈伤组织褐化率降低。

表3 附加物对抑制愈伤组织褐化的影响

处理	外植体总数 个	褐化数 个	褐化率 %	生长势
对照	62	16	25.81	+
处理	86	18	20.93	+
处理	86	16	18.60	+
处理	96	12	12.50	++
处理	67	5	7.46	+++
处理	69	1	1.45	+++
处理	68	3	4.41	++

2.2 不同培养基和激素组合对喜树愈伤组织诱导的影响 由表2可见,愈伤组织出现先后因外植体而异,幼叶切块最早14 d时在边缘切口处出现愈伤组织,种胚最早9 d即可看到胚轴膨大的两端长出愈伤组织。愈伤组织诱导率因基本培养基种类、激素配比和外植体而异,使用SH培养基诱导时幼叶出愈率显著高于种胚,使用B5、MS培养基诱导时种胚出愈率高于幼叶。愈伤组织质地也由基本培养基、激素配比和外植体不同而不同,一般随着基本培养基离子浓度的增加,愈伤组织由致密变得疏松。从总体上看,幼叶外植体愈伤组织诱导率SH>B5>MS,而生长势是MS>B5>SH;种胚外植体愈伤组织诱导率MS>B5>SH,生长势MS>B5>SH。正交试验的直观分析显示,幼叶愈伤组织的最佳诱导培养基为:SH+NAA 2.5+2,4-D 0.50+6-BA 0.25;种胚愈伤组织的最佳诱导培养基为:MS+2,4-D 1.00+6-BA 0.50。方差分析结果显示,影响幼叶愈伤组织诱导率的因素中,基本培养基、NAA和2,4-D达到显著水平(P<0.01),影响种胚愈伤组织诱导率的因素中,基本培养基达到显著水平(P<0.01)。说明基本培养基对于两种外植体愈伤组织诱导都起到关键作用,种胚的外植体较易产生愈伤组织,而幼叶的外植体除受到基本培养基影响外,还受到NAA和2,4-D的影响。

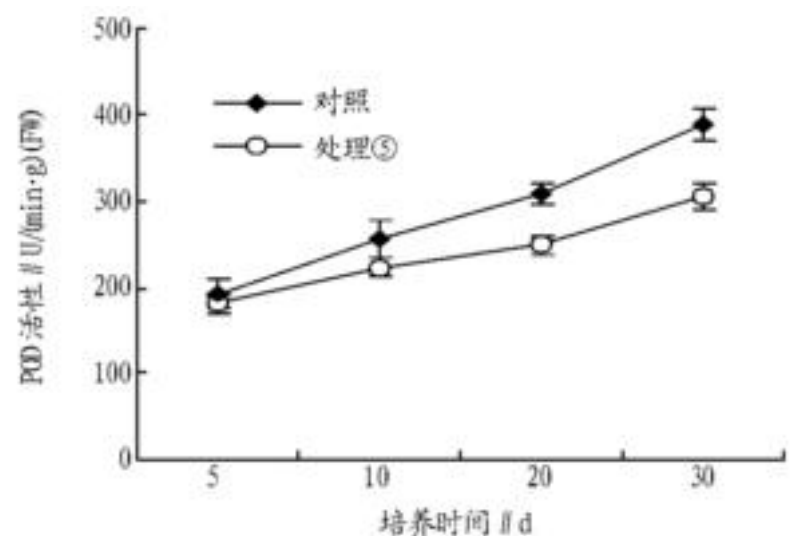


图1 POD酶活性的测定

2.4 转换培养基对愈伤组织形态及褐化的影响 在愈伤组织诱导中,不同培养基生长的愈伤组织状态不一样,研究发现,不同状态的愈伤组织褐化情况也不同。SH培养基诱导出的愈伤组织结构较致密(图3-A),将此愈伤组织转移到相应的MS培养基中继代培养,其结构致密的愈伤组织逐渐转

变为结构松软型(图3-B)。用幼叶愈伤组织的最佳诱导培养基SH+NAA 2.5+2,4-D 0.50+6-BA 0.25进行继代培养,继代1~3次的褐化率分别为:26.36%、50.25%、78.33%;用相对的MS培养基继代1~3次的褐化率分别为:27.33%、33.33%、52.07%;原SH培养基继代1次后转换到MS培养基继代2~3次的褐化率分别为:30.54%、44.87%。说明用SH培养基继代培养的愈伤组织第2次继代时转移到相对的MS培养基培养,可以显著降低褐化率。

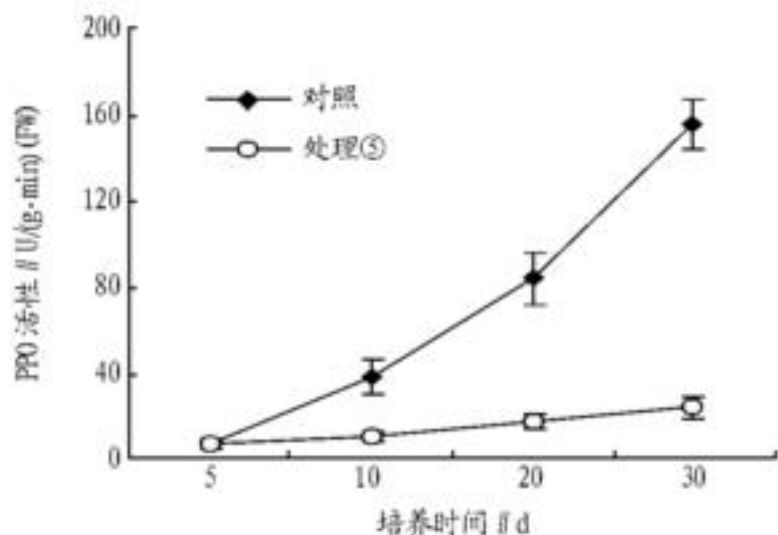
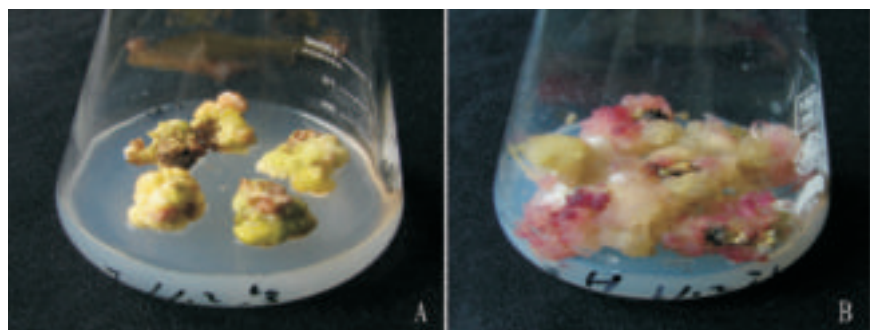


图2 PPO酶活性的测定



注:A.愈伤组织培养于SH培养基;B.愈伤组织培养于MS培养基。

图3 愈伤组织形态变化

### 3 讨论

不同的外植体诱导愈伤组织的能力是不同的,以多年生的喜树幼叶为外植体,愈伤组织的诱导率较低,且容易受外植体大小和培养基表面残留水分的影响,而种胚的外植体较容易产生愈伤组织。用叶片诱导愈伤组织,叶片切块越小,切面与体积的比率越大,伤害和褐变的程度就越大<sup>[11]</sup>。Reuveri等<sup>[12]</sup>用椰子的完整叶片作外植体培养,很少发生褐化,故外植体选择切片较大的叶片,有利于防止外植体的褐化。种胚可能因为具有较强的分生能力,很少有褐化现象。幼叶外植体和种胚外植体的最适基本培养基不同,幼叶外植

体适合SH培养基,种胚外植体适合MS培养基,这可能与其本身的抗褐化和脱分化的能力,以及基本培养基的营养离子组成有关。

该试验表明,培养基中附加30 ng/L抗坏血酸和5 g/L活性炭可以有效抑制继代培养中愈伤组织的褐化率,通过测定PPO和POD的酶活力,显示PPO酶的活性受到显著抑制,而POD酶活性受到的抑制不如PPO明显。这可以解释为,愈伤组织中的PPO将酚类物质氧化为醌类,这些醌类物质扩散到培养基中使整个外植体褐化<sup>[13]</sup>,抗坏血酸是一种强抗氧化剂,可以抑制PPO的酶活性<sup>[14]</sup>,活性炭是一种吸附剂,可以吸附培养基中的醌类物质<sup>[15]</sup>,两者的组合对抑制PPO酶的活性起到了显著作用。

### 参考文献

- [1] WALL ME, WAN MC, COCK C E, et al. Flant Antitumor agent. I. the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Amer Chem Soc*, 1966, 88(16): 3888 - 3890.
- [2] HSANG Y H, HERZBERG R, HECHIS, et al. Camptothecin induces protein linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(27): 14873 - 14878.
- [3] 张启香, 方炎明. 喜树组织培养初步研究 [J]. *江苏林业科技*, 2005, 35(3): 1 - 3.
- [4] 潘学武, 刘欣, 吕应堂. 喜树胚轴细胞悬浮培养的优化和喜树碱的积累 [J]. *中草药*, 2005, 36(8): 1221 - 1225.
- [5] WANG H, ZU Y, WANG W, et al. Establishment of *Camptotheca acuminata* regeneration from leaf explants [J]. *Bdoga Hartarum*, 2006, 50(4): 725 - 728.
- [6] FRANCO ZUNINO, DALAVALE S, LACCABUE D, et al. Current status and perspectives in the development of camptothecins [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8: 2505 - 2520.
- [7] MA M, YUT, DAI S, et al. Determination of contents of 10-hydroxycamptothecin in *Camptotheca acuminata* by high performance liquid chromatography [J]. *J Forest Res*, 2002, 13(2): 144 - 146.
- [8] ZU YUANGANG. *Camptothecin Derivatives* [M]. Beijing: Science Press, 2006: 63 - 69, 79 - 87.
- [9] 李丽, 张湮帆, 何康, 等. 两种红豆杉植物的愈伤组织培养及褐化抑制 [J]. *复旦学报: 自然科学版*, 2006, 45(6): 702 - 707.
- [10] 张盛林, 郑莲姬, 钟耕. 花魔芋和白魔芋褐变机理及褐变抑制研究 [J]. *农业工程学报*, 2007, 23(2): 207 - 212.
- [11] BONGA J M, DURZAN D J. 树木组织培养 [M] // 阙国宁, 郭达初, 李金田, 译. 北京: 中国林业出版社, 1998: 25 - 26, 141 - 143, 175.
- [12] REUVENI O, KIPNIS HL. Studies of the in vitro culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues and organs [J]. *Panphlet*, 1974, 145: 20.
- [13] 李浚明, 编译. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996: 345.
- [14] 常成, 张海萍, 尤明山, 等. 抗坏血酸对小麦多酚氧化酶活性抑制的研究 [J]. *中国粮油学报*, 2007, 22(1): 14 - 18.
- [15] 李凤华, 汤绍虎, 孙一铭, 等. 降低何首乌愈伤组织褐化研究 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2005, 30(2): 337 - 340.